Code No. FIK-203
保存温度 −20℃

ノロウイルス検出キット G1/G2

(Code No. FIK-203)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A4997K

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

本製品は、糞便検体からノロウイルス genogroup GI 、genogroup GII 遺伝子を RT-PCR 法で検出するキットです。

特長

- マルチプレックス PCR によりGI、GIIいずれのタイプも検出可能です。
- 逆転写反応から PCR までを1ステップで行います。反応途中で試薬を添加する必要はありません。
- EvaGreen®を用いた融解曲線解析による判定を行います。電気泳動の必要はありません。
- サンプルの処理は、専用の懸濁液による処理(15 分)、および前処理液による熱処理(1 分)のみです。核酸の抽出精製は必要ありません。
- 弊社姉妹品 ノロウイルス検出キット G1(コード No.FIK-201)、ノロウイルス検出キット G2(コード No.FIK-202)、と同じプロトコールです。1 台のサーマルサイクラーでこれらのキットを同時に反応することができます。
- 内部標準コントロール DNA を含んでいます。PCR の阻害による偽陰性を回避します。
- キャリーオーバー汚染防止のため、ウラシルグリコシダーゼによる増幅産物の分解を行います。
- ステップダウン反応により高い特異性で高感度を達成しています。最小検出感度は 1 反応当たり 50 コピーです。

1. 安全上の注意

- 本製品に含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。
- **本製品は臨床診断薬ではありません。診断および臨床検査には使用しないでください。**
- 本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

2. 本製品に含まれる物

試薬名	ラベルの色	容量
①懸濁液	茶色	20mL
②前処理液	橙色	400µL
③反応液	青色	3,300µL
④酵素液	灰色	450µL
⑤プライマー液(G1/G2)	赤色	500µL
⑥EvaGreen® dye, 20X in water	緑色	250µL

- EvaGreen®は米国 Biotium Inc.の製品です。東洋紡は Biotium Inc.との契約のもと本製品を販売しています。

3. 保存温度

- **本製品に含まれる試薬はすべて-20℃保存です。**
- 使用する直前に解凍し、よく混和してください。その後、スピンダウンしてからチューブのふたを開けてください。
- 使用後は速やかに-20℃で保存してください。

4. 使用に必要な機器

- リアルタイム PCR 装置
- 遠心機 12,000rpm 以上
- ピペットなど
- チップ、チューブなど消耗品

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

5. 使用する便検体
・新鮮便検体または凍結便検体

6. プロトコール
（1）懸濁
・マイクロチューブに①懸濁液を 200μL 分注します。
・新鮮便検体または凍結便検体を①懸濁液に **5~10%**となるように懸濁します。検体量は耳かき一杯分くらいが目安です。
・室温で 15 分間静置します。
・**12,000rpm で 5 分間**、遠心分離を行います。この後、懸濁液の上清を使用します。
・直ちに次の工程にはいります。（懸濁液は保存できません）

（2）前処理
・下記の量を PCR チューブに調製してください。

	1 反応あたりの調製量
(1)の懸濁液上清	1μL
②前処理液	4μL
合計	5μL

・サーマルサイクラーで **85℃ 1 分間**、熱処理します。
・直ちに次の工程にはいります。（熱処理後の液は保存できません）

（3）RT-PCR 反応液の調製、添加
・1反応あたり下記の量を必要反応数分マスターミックスとして調製します。

	1 反応あたりの調製量
③反応液	33.0 μL
④酵素液	4.5 μL
⑤プライマー液（G1/G2）	5.0 μL
⑥EvaGreen® dye, 20X in water	2.5 μL
合計	45.0 μL

・1 反応あたり 45μL を（2）の前処理済み懸濁液に添加します。
・新しいチューブキャップでふたをします。（2）の前処理で使用したチューブキャップは使用しないでください。気密性が保たれずに反応液が蒸発することがあります。
・直ちに次の温度サイクル反応を行います。

一度に多くのサンプルを取り扱う際の注意
Mini Opticon™（Bio-Rad 社）ではチューブの他にプレートの使用は可能ですが、
StepOnePlus™（Applied Biosystems®社）ではプレートを使用しないでください。

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

（4）RT-PCR サイクル、融解曲線解析条件

・ 下記の温度サイクルで反応します。

	Mini Opticon™		StepOnePlus™	
UNG反応	20℃, 5分		20℃, 5分	
逆転写反応	50℃, 5分		50℃, 5分	
プレ変性	95℃, 5分		95℃, 5分	
変性 会合・伸長	94℃,10秒 58℃,45秒	5サイクル	94℃,10秒 58℃,60秒	5サイクル
変性 会合・伸長	94℃,10秒 56℃,45秒	10サイクル	94℃,10秒 56℃,60秒	10サイクル
変性 会合・伸長	94℃,10秒 54℃,45秒	15サイクル	94℃,10秒 54℃,60秒	15サイクル
変性 会合・伸長	94℃,10秒 52℃,45秒	20サイクル	94℃,10秒 52℃,60秒	20サイクル
変性 融解曲線解析	95℃,10秒 70℃,5秒→90℃	0.5℃/ステップ*	95℃,15秒 65℃,60秒→90℃	0.3℃/ステップ*

その他の機種については弊社までお問い合わせください。

* 融解曲線解析のデータ収集ポイント

使用する機器によっては、融解曲線にがたつきが見られることがあります。その場合は、データ収集ポイントを0.3℃/ステップに変更すると改善することがあります。融解曲線解析のみ再度行ってください。

7. 判定

・ 融解曲線のピークの温度とベースラインの比較から下記の表により判定を行います。

【ベースラインの設定】

融解曲線の 75℃と 82℃の点を結んだ直線がベースラインになります。

【陽性ピークの判定】

下記表の温度帯でベースラインよりも上に融解曲線のピークがある場合、ピークありと判定します。

【内部標準の判定】

次の 2 点を満たした場合、内部標準のピークありと判定します。

・ 融解曲線の 82℃と 87℃の間にピークがあること。

・ 融解曲線の 82℃と 87℃の点を結んだ直線とピークのシグナル強度の比が 1.5 以上であること。

※温度値は Mini Opticon™（Bio-Rad 社）での測定値です。機種によっては値が前後する場合があります。

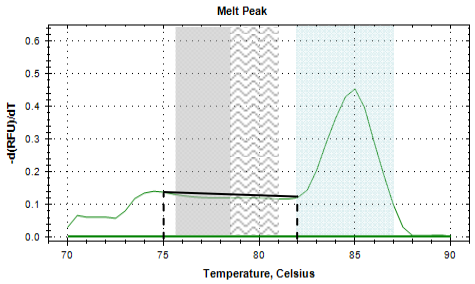
ピーク位置			判定
GI 75.5～78.5℃※	GII 78.5～81.0℃※	内部標準 82～87℃※	
あり	なし	ありまたはなし	**GI陽性**
なし	あり	ありまたはなし	**GII陽性**
なし	なし	あり	**陰性**
なし	なし	なし	**判定不能**

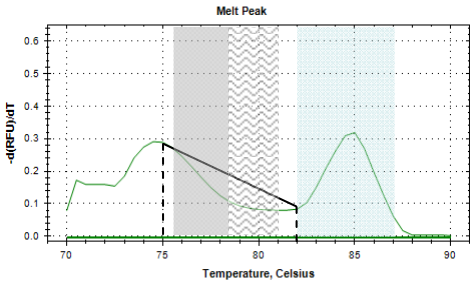
＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

- ✧ 78.5℃にピークが現れた場合は陽性と判定します。この場合、GI,GII の判別はつきません。
- ✧ GI または GII 由来の増幅が優勢になった場合、内部標準のピークが観察されないことがありますが、反応は成立しており陽性と判定します。
- ✧ **本製品では GI 陽性または GII 陽性となった場合でも、GI、GII の混合感染の可能性は否定されません。タイプ別の判定が必要な場合は、それぞれの検出キットをご利用ください。**
- ✧ 上記のいずれの箇所にもピークが認められない場合、反応が阻害されており判定不能となります。
- ✧ 検体によっては、75℃以下にピークやシグナルが観察されることがありますが、これは判定には影響しません。
- ✧ これらの判定をパソコンで行うソフトウェアをご用意しております。詳細は下記の弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

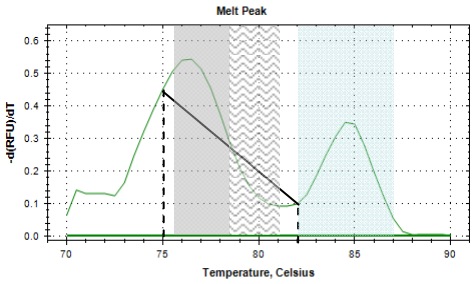
融解曲線の例

陰性

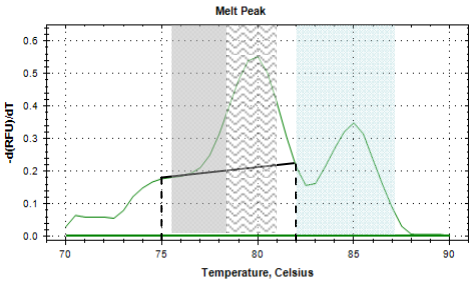




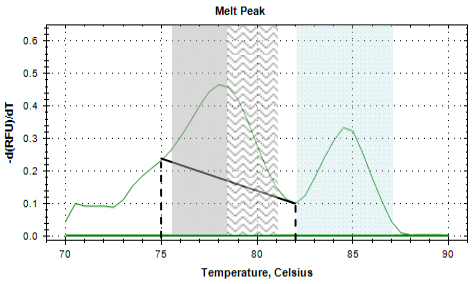
GI 陽性



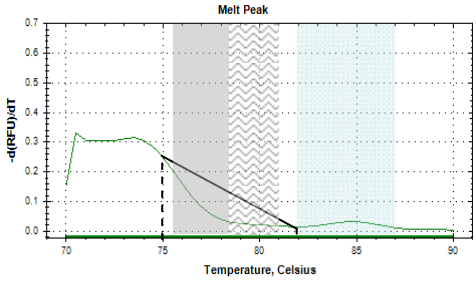
GII 陽性



陽性（型別判定不能）



判定不能



＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

8. トラブルシューティング

問題	対策	具体例･目安
判定不能になる。 ピークが出ない。	便の懸濁量を少なくして再検査する。	遠心後の上清の色調は黄色くなる程度が適当です。赤茶色い場合は便量が過剰です。
	各工程終了後直ちに次工程へ進む。	最大でも 1 時間以内に次工程へ進んでください。
	反応容器を 8 連チューブに変更する。	一部の機器と 96 ウェル PCR プレートの組み合わせでは、熱伝導効率の影響でシグナルが十分でない場合があります。
	試薬を新しいものに交換する。	キャリーオーバー汚染が疑われます。
	器具類をオートクレーブする。	
融解曲線の波形がいびつである。	融解曲線解析のデータ収集ポイントの間隔を狭める。	0.3℃/ステップとする。
陰性コントロールが陽性になる。 すべての検体が陽性になる。	試薬を新しいものに交換する。	キャリーオーバー汚染が疑われます。
	器具類をオートクレーブする。	

9. 関連商品

品　名	包装	Code.No.
ノロウイルス検出キット　G1	100 反応	FIK-201
ノロウイルス検出キット　G2	100 反応	FIK-202
腸内細菌遺伝子検出キット –マルチ PCR–	500 反応	FIK-101

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

Label License Statement

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

１０. This product is provided under an Agreement between Biotium and TOYOBO. The manufacture, use, sale, offer for sale, or import of this product is subject to one or more patents or pending applications owned or licensed by Biotium, Inc. (U.S. Patent Nos. US7,803,943 B2, US7,776, 567 B2, Japan Patent No. 5249013). The purchase price of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patent Nos. US7,803,943 B2, US7,776, 567 B2, Japan Patent No. 5249013 and corresponding patent claims outside of the United States, to use only the purchased amount of the product and components of the product solely for the buyer's own internal research (whether the buyer is an academic or for-profit entity), in a manner consistent with the accompanying product literature. No right to use, sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party, or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for any other purpose or a Commercial Purpose, is hereby granted expressly, by implication or by estoppel. Commercial Purpose means any activity by a party for consideration and include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service including without limitation, reporting information or data resulting from use of the product or a its components for a fee or other commercial consideration; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. For products that are subject to multiple limited use label licenses, the most restrictive terms apply. This product is for research use only. Diagnostic uses require a separate license from Biotium, Inc. For information on purchasing a license to this product including for purposes other than research, contact Director of Licensing, Biotium, Inc., 3159 Corporate Place, Hayward, CA 94545, Tel: +1-(510) 265-1027. Fax: +1-(510) 265-1352. Email: btinfo@biotium.com. All names containing the designation® are trademarks of Biotium.

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

【製造･販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(大阪)

〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(東京)

〒104-8345　東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819　FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp